Comparación de anticoagulantes de heparina de litio y sodio en la bioquímica plasmática del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*), en Campeche, México

Comparison of sodium and lithium heparin anticoagulants in plasma biochemistry of Morelet´s crocodiles (*Crocodylus moreletii*) in Campeche, Mexico

Sergio E. Padilla*† Manuel Weber* Elliott Jacobson**

Abstract

Lithium heparin and sodium heparin anticoagulants were compared with the aim to measure concentrations and activity of selected plasma biochemical analytes in wild and captive Morelet's crocodiles (*Crocodylus moreletii*). Blood samples were obtained from the ventral caudal tail vein in 63 crocodiles (32 wild and 30captive) and each sample was placed in both lithium heparin and sodium heparin. Plasma was removed and duplicate samples were assayed for the following: cholesterol, glucose, uric acid, creatinine and alanine aminotransferase (ALT). The only analyte having a significant difference ($t = -2.95$, $df = 56$, $P < 0.01$) when comparing the two anticoagulants was ALT. Still, the difference was not considered to be clinically significant. The results of this study indicates that the type of heparin used as an anticoagulant, does not affect concentratrions and activity of certain plasma biochemicals of Morelet's crocodiles, and perhaps other species of crocodilians.

Key words: ANTICOAGULANTS, CAMPECHE, CROCODILE, *CROCODYLUS MORELETII*, PLASMA BIOCHEMISTRY, HEPARIN.

Resumen

Los anticoagulantes de heparina de litio y heparina de sodio se compararon con el objetivo de medir las concentraciones y actividad de analitos bioquímicos seleccionados en el plasma de cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*). Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal de 63 cocodrilos (32 silvestres y 30 en cautiverio), cada muestra se analizó en heparina de litio y heparina de sodio. Se obtuvo el plasma y las muestras pareadas fueron analizadas para los siguientes analitos: Colesterol, glucosa, ácido úrico, creatinina y alanina aminotransferasa (ALT). El único analito que mostró una diferencia significativa ($t = -2.95$, $gl = 56$, $P < 0.01$) fue el ALT para ambos anticoagulantes; sin embargo, la diferencia no se considera clínicamente significativa. Los resultados de este estudio indican que el tipo de heparina usado como anticoagulante no afecta las concentraciones y actividades de la bioquímica plasmática del cocodrilo de pantano y quizá de otras especies de cocodrilianos.

Palabras clave: ANTICOAGULANTE, BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS, CAMPECHE, COCODRILOS, *CROCODYLUS MORELETII*, HEPARINA.

Recibido el 5 de marzo de 2008 y aceptado el 25 de abril de 2009.

*Departamento de Ecología y Sistemática Terrestres, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Calle 10 núm. 264, Centro, Campeche, Campeche, 24000, Mexico.

**Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610-0126, USA.

†Dirección actual: Centro de Estudios en Desarrollo Sustentable y Aprovechamiento de la Vida Silvestre, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar s/n, 24030, Campeche, Campeche, México.

Nota: Este trabajo forma parte de la tesis de Maestría en Ciencias del primer autor.

Correspondencia: Manuel Weber, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Calle 10 núm. 264, Campeche, Campeche, 24000, Mexico. Correo electrónico: mweber@ecosur.mx Tel/Fax: 52 (981) 816-4221, ext. 2300.

Introduction

In reptiles, the type of anticoagulant used is known to affect concentrations and activity of plasma biochemicals. A comparative study on the use of EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) and heparin as anticoagulants in the green iguana, *Iguana iguana*, indicated that it was better to use EDTA for blood analysis.[1] However, other researchers have used lithium heparin and sodium heparin when performing biochemical analysis of the blood of reptiles.[2-5] These studies demonstrated that there were no significant differences in the use of these anticoagulants for the blood analysis of certain reptiles. However, there are no similar reports in crocodilians. The objective of the current study was to evaluate and compare sodium heparin and lithium heparin as anticoagulants for measuring selected biochemical analytes in wild and captive Morelet´s crocodiles in Campeche, Mexico.

Two crocodile populations were used in this study. Official capture and handling permits were obtained from Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), throughout Direccion General de Vida Silvestre (permit number: SGPA/DGVS/00671/07). Wild Morelet's crocodiles were captured from April to September 2007 in the wetlands of the northern coast of Campeche, Mexico (20°51'35" and 19°49'00" N latitude and 90°45'15" and 90°20'00" W longitud). This region, locally known as Petenes (Island in Mayan language), is a low land profile, low altitude salt-marsh region with permanent freshwater availability.[6] Part of this region was declared by UNESCO and the Mexican government as the Petenes Biosphere Reserve (RBLP for its name in Spanish) in 1999 encompassing an area of 282 857 hectares. The captive population that was sampled belongs to Centro de Estudios Tecnologicos del Mar No. 2 (CETMAR), a technological high-school specializing in fisheries training in Campeche. The CETMAR holds a captive population of about 300 Morelet's crocodiles, in all biological stages, from newborns to reproductive adults.

Capture of wild crocodiles was done at night by using spotlights, headlamps and Thompson steel snares attached to aluminum poles.[7, 8] The crocodiles were manually restrained using rubber bands to tap the jaws and the limbs of the adults were tied. Sexing was performed by cloacal palpation[9] and the crocodiles were classified according to their age (total body length), as follows: class I (< 500 mm), class II (> 501 and < 1 000 mm), class III (> 1 001 and < 1 500 mm) and class IV (> 1 501 mm).[10,11]

A blood sample was obtained from the ventral caudal tail vein of each crocodile using sterile syringes (5 and 3 mL) attached with a 3.5 cm long, 22 and 23 gauge needles.[12] Each sample was aliquoted

Introducción

Se ha sugerido que el uso de anticoagulantes sanguíneos afecta los resultados de los análisis bioquímicos en reptiles. Un estudio comparativo entre el uso de EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) y un anticoagulante a base de heparinas,[1] sugiere que es mejor usar EDTA al analizar la sangre de iguanas (*Iguana iguana*). Sin embargo, otros autores recomiendan utilizar anticoagulantes de heparina de litio en reptiles.[2,3] Asimismo, la heparina de sodio se ha utilizado también en estudios hematológicos de reptiles, al comparar los efectos de ambos tipos de heparinas en los resultados.[4,5] Los resultados de estos estudios sugieren que no existen diferencias significativas entre estos dos tipos de heparinas en el análisis bioquímico sanguíneo en algunos grupos de reptiles. Sin embargo, no se ha realizado ningún trabajo sobre el uso de anticoagulantes en la bioquímica sanguínea de cocodrilos. Este estudio analiza el efecto del tipo de heparina en los resultados de bioquímica plasmática en poblaciones silvestres y en cautiverio del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*), en Campeche, México.

Se trabajó con dos poblaciones de cocodrilos de pantano. Se obtuvieron los permisos correspondientes de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), mediante la Dirección General de Vida Silvestre (Oficio SGPA/DGVS/00671/07). La captura de cocodrilos silvestres se realizó de abril a septiembre de 2007 en los humedales costeros del norte de Campeche. Éstos forman parte del ecosistema conocido como Petenes, que en lengua maya significa isla. Se trata de una región con topografía de poco contraste en altitud, que carece de una red fluvial superficial.[6] En 1999 parte de esta región fue decretada como Reserva de la Biosfera Los Petenes (RBLP), con extensión de 282 857 hectáreas en las coordenadas 20°51'35" y 19°49'00" de latitud Norte y los 90°45'15" y 90°20'00" de longitud Oeste. La población en cautiverio estudiada pertenece al Centro de Estudios Tecnológicos del Mar núm. 2 (CETMAR), ubicado en San Francisco de Campeche. El CETMAR tiene una población aproximada de 300 cocodrilos de pantano en todas sus etapas biológicas, desde críos, hasta adultos reproductores.

La observación y captura de cocodrilos se realizó con el método de conteos directos,[7,8] consiste en usar un *reflector* y lámparas de cabeza de diferente intensidad. La captura de los animales avistados se llevó a cabo con lazos Thompson (cable de acero inoxidable) y pértigas de aluminio o de manera manual. Los cocodrilos se inmovilizaron de manera manual. El sexo de los individuos se determinó a través de palpación cloacal.[9] Los cocodrilos se clasificaron según su

into two tubes each of lithium and sodium heparin. The total volume of blood obtained depend on the weight of the crocodile, in this study, it was between 90 to 38 000 grams. Never exceeded 0.1% of the total body weight.[13] Blood was collected in 3 mL Vacutainer* tubes containing sodium heparin and lithium heparin.[2,3,14] Samples of anticoagulated whole blood were transported to a laboratory in cool boxes at 4°C where samples were centrifuged and plasma removed and analyzed within 8 hours after collection.[15]

The laboratory analyses were performed in the Laboratorio Central de Patología Animal (LACEPAC), Comité Estatal para el Fomento y Producción Pecuaria del Estado de Campeche. The plasma analytes selected for measurement were: glucose, cholesterol, uric acid, creatinine, and alanine aminotransferase (ALT). All the plasma biochemical tests were performed using an automatic analyzer**, following their standard protocol.[16]

For each variable (analyte) a Kolmogorov–Smirnov test was used to determine if the values were normally distributed ($P < 0.05$). For analytes that were normally distributed, parametric tests [Analysis of Variance (ANOVA) and t tests] were used for comparing plasma biochemical values in samples anticoagulated with lithium and sodium heparin. For those analytes that were not normally distributed, a non-parametric Wilcoxon's signed rank test[17] was performed to look at differences in the values obtained using the two anticoagulants. An assessment for mean differences between wild and captive crocodiles was performed using a paired samples t test (equal variance assumptions fulfilled; Levene test, $P > 0.05$)) and a Mann-Whitney test (when variances were not equal). A t test for paired samples (for sexes) and ANOVA's (for age classes) were performed to look at differences in the plasma biochemical values. All statistical analysis was performed using SPSS 13.***

A total of 62 paired blood samples were obtained, with 32 samples from wild and 30 from captive crocodiles (Table 1).

The t tests indicated that, except for ALT ($t = -2.95$, df =56, $P < 0.01$) (Table 2), there were no statistical differences ($P < 0.05$) in plasma biochemcal values for samples anticoagulated with sodium and lithium heparin. The Wilcoxon test indicated that there are no statistical differences in the values of uric acid ($Z = -0.735$, $P > 0.05$) among anticoagulants (Figure 1).

A comparison between wild and captive crocodiles found statistical differences in the cholesterol values by anticoagulant ($P < 0.05$). A Mann-Whitney test for glucose and uric acid suggest statistical differences for these metabolites in the sodium heparin samples ($P < 0.05$), but not in the lithium heparin samples ($P > 0.05$), between wild and captive crocodiles (Figure 2).

clase de edad en: Clase I (< 500 mm), clase II (> 501 y < 1 000 mm), clase III (> 1 001 y < 1 500 mm) y clase IV (> 1501 mm).[10,11]

Se extrajo sangre de la vena caudal, utilizando jeringas estériles de 5 y 3 mL (dependiendo de la cantidad a extraer) con aguja de calibres número 22 o 23.[12] La cantidad de sangre extraída dependió del peso de cada cocodrilo, que en este estudio fue de 90 a 38 000 gramos y nunca sobrepasó más del 0.1% del peso corporal.[13] La sangre recolectada se virtió en tubos Vacutainer* de heparina de litio y heparina de sodio de 3 mL para prevenir la coagulación.[2,3,14] Las muestras fueron analizadas antes de transcurridas ocho horas posteriores a la toma de muestras y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.[15]

Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio Central de Patología Animal (LACEPAC), del Comité Estatal para el Fomento y Producción Pecuaria del estado de Campeche. Se determinaron los valores de glucosa, colesterol, acido úrico, creatinina y alanina-aminotransferasa (ALT) en las muestras de sangre obtenidas de cocodrilos silvestres y en cautiverio. Todas las pruebas se realizaron en un equipo automatizado,** siguiendo los protocolos de la línea líquida establecidos para este equipo.[16]

A todas las variables analizadas se les sometió a pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, para explorar si su distribución se ajustaba a la de una distribución normal ($P < 0.05$). La mayor parte de las variables se ajustaron a la distribución normal, con excepción del ácido úrico. Cuando la distribución fue diferente a la normal se utilizó estadística no paramétrica. Para encontrar diferencias entre los tipos de anticoagulante utilizado, se aplicó una prueba de t para muestras pareadas, salvo el ácido úrico que se analizó con una prueba de signos de Wilcoxon.[17] Diferencias entre medias de cocodrilos silvestres y en cautiverio se realizaron con pruebas de t para muestras pareadas (a los valores que tuvieron igualdad de varianzas) y una prueba de Mann-Whitney (a los valores con varianzas distintas). Entre sexos y clases de edad, las bioquímicas sanguíneas de los cocodrilos demostraron tener varianzas iguales (prueba de Levene, $P > 0.05$), por lo que se analizaron con una prueba de t para muestras independientes y un ANDEVA de una vía, respectivamente. Los datos se analizaron en el programa SPSS versión 13.***

Se estudiaron 62 muestras pareadas de bioquímicas sanguíneas con dos tipos de anticoagulante (heparina de litio y heparina de sodio). Del total de

*Beckton Dickinson, Tepotzotlán, Estado de México.
**Wiener Laboratorio Modelo Metrolab, 1600, DR, Argentina.
***SPSS, Inc, Chicago, III, Estados Unidos de América.

A significant difference was found in the cholesterol values of lithium heparin among sexes (t = 2.23, df = 59, P < 0.05), with the females presenting higher values than the males (Figure 3).

No statistical difference was found among age (size) classes that were sampled. Because of their small size (< 50 cm long), enough blood could not be obtained from class I crocodiles in a humane and safe manner (Table 3).

It has been suggested that the type of anticoagulant may affect clotting time and the concentration of several plasma analytes in reptiles.[2] The methods used in handling blood samples is also an important factor that may affect analyte values.[15] For example, there is some variation in ALT concentration with the length of time from collection to analysis[16] In Morelet's crocodiles, handling of samples and time from collection to analysis were carefully monitored and controlled, so that little or no variation might be attributed to these confounding variables.

Comparing both types of anticoagulants, there

muestras, 32 correspondieron a cocodrilos silvestres y 30 a cocodrilos en cautiverio (Cuadro 1).

Al comparar entre los tipos de anticoagulante utilizado, la prueba de t para muestras pareadas, indica que no existen diferencias significativas (P > 0.05) entre los valores de química sanguínea analizados, con excepción del ALT, donde sí existen diferencias significativas (t = –2.95, gl = 56, P < 0.01) según el tipo de anticoagulante utilizado (Cuadro 2). El ácido úrico se analizó con una prueba de Wilcoxon, que sugiere que no hay diferencias significativas (Z = –0.735, P > 0.05) en los valores de este parámetro con respecto al anticoagulante (Figura 1).

Se encontraron diferencias significativas con una prueba de t entre cocodrilos silvestres y en cautiverio para colesterol en ambos tipos de anticoagulante (P < 0.05); para las demás pruebas no se observaron diferencias significativas. Se hizo una prueba de Mann-Whitney para la glucosa y el ácido úrico, se observó que existen diferencias significativas en el ácido úrico y para la glucosa con heparina de sodio (P < 0.05),

Cuadro 1

VALORES DE BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS CON DOS TIPOS DE HEPARINA COMO ANTICOAGULANTE EN *C. moreletii* EN CAMPECHE, MÉXICO

PLASMA BIOCHEMISTRY ANALYSIS OF SELECTED PARAMETERS WITH TWO TYPES OF HEPARIN ANTICOAGULANT IN MORELET´S CROCODILES (*C. moreletii*) IN CAMPECHE, MEXICO

			Mean	*Minimum*	*Maximun*	*Standard error*
Lithium heparin	Glucose	g/L	69.55	36.34	132.52	2.65
	Cholesterol	g/L	250.14	79.24	520.11	11.50
	Uric acid	mg/L	3.04	.12	13.15	.33
	Creatinine	mg/L	2.70	1.16	7.77	.13
	ALT	U/L	20.20	.06	58.88	1.76
Sodium heparin						
	Glucose	g/L	69.95	31.54	119.74	2.81
	Cholesterol	g/L	255.41	89.70	525.49	12.47
	Uric acid	mg/L	3.26	.05	13.32	.375
	Creatinine	mg/L	3.97	1.23	83.13	1.417
	ALT	U/L	21.49	.00	50.51	1.68

Note: See table 4 for statistical differences. Uric acid was not statistically tested because it did not prove to be normally distributed

were no significant differences in the majority of the analyzed parameters. Unfortunately, no similar studies exist in this or other species of crocodilians, so that comparisons with the literature were not possible. However, these results concur with those obtained for loggerhead (*Caretta caretta*)[4] and leatherback (*Dermochelys coriacea*)[5] sea turtles. In these species, no differences in plasma biochemical values were found in the use of these two types of heparins. Nevertheless, there are some shortcomings in the results of these studies. In the first study[4] paired samples were obtained, while unpaired samples were analyzed in the second.[5] Paired samples of each crocodile were analyzed and pero no para glucosa con heparina de litio ($P > 0.05$) entre cocodrilos silvestres y en cautiverio (Figura 2).

El resultado de la prueba de t muestra que sólo existieron diferencias significativas ($t = 2.23$, $gl = 59$, $P < 0.05$), para el colesterol con heparina de litio entre sexos; los valores fueron más altos en hembras que en machos. Para los demás parámetros no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) (Figura 3).

No hubo diferencias estadísticas significativas entre clases de edad en los parámetros químicos analizados ($P \geq 0.05$) (Cuadro 3). En este análisis no se tomaron muestras de cocodrilos de la clase I (menores de 50 cm de largo), ya que por su tamaño y peso no se pudo

Cuadro 2

PRUEBA DE t PARA MUESTRAS PAREADAS DE GLUCOSA, COLESTEROL, CREATININA Y ALT ENTRE TIPOS DE ANTICOAGULANTE: HEPARINA DE LITIO Y HEPARINA DE SODIO EN *C. moreletii* EN CAMPECHE, MÉXICO

PAIRED t TEST FOR GLUCOSE, CHOLESTEROL, CREATININE AND ALT WITH TWO TYPES OF HEPARINS AS ANTICOAGULANT IN *C. moreletii* IN CAMPECHE, MEXICO

		t	*df*	*P*
Pair 1	Lithium glucose - Sodium glucose	.236	56	.815
Pair 2	Lithium cholesterol - Sodium cholesterol	.581	56	.563
Pair 3	Lithium creatinine - Sodium creatinine	–.861	56	.393
Pair 4	Lithium ALT - Sodium ALT	–2.951	56	.005

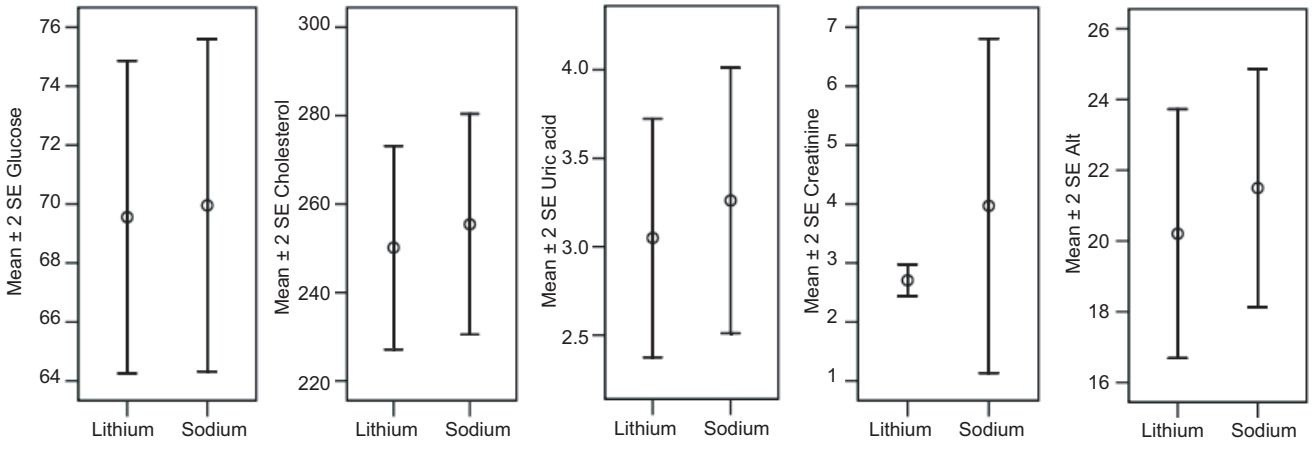

Figura 1: Valores medios y error estándar de glucosa, colesterol, ácido úrico y creatinina con dos tipos de anticoagulante de heparina en cocodrilos de pantano *C. moreletii* en Campeche, México.

Figure 1: Mean and standard errors of glucose, cholesterol, uric acid and creatinine with two types of heparin as anticoagulant in Morelet´s crocodiles (*C. moreletii*) in Campeche, Mexico.

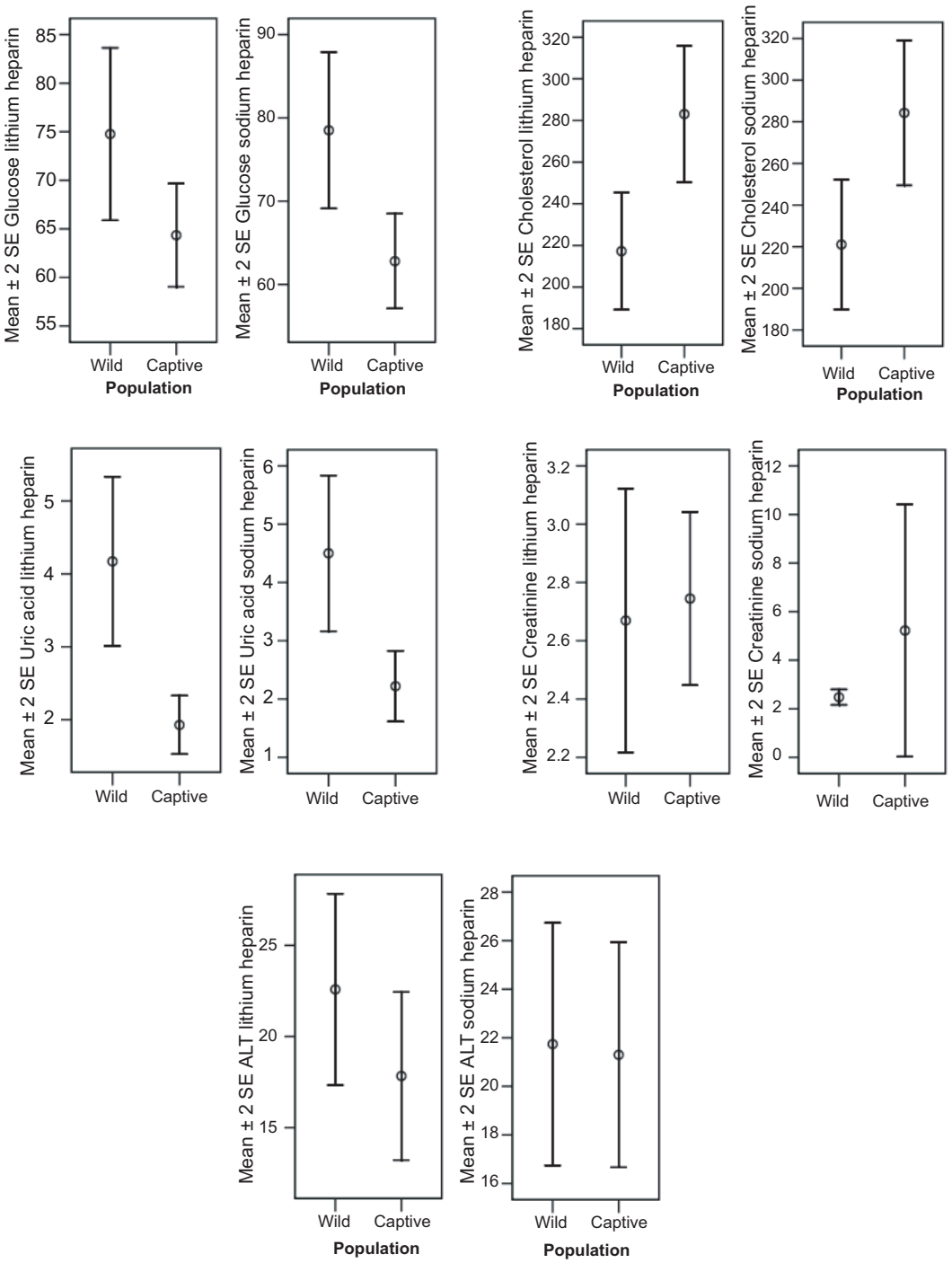
Mean ± 2 SE Glucose lithium heparin
Mean ± 2 SE Glucose sodium heparin
Mean ± 2 SE Cholesterol lithium heparin
Mean ± 2 SE Cholesterol sodium heparin
Mean ± 2 SE Uric acid lithium heparin
Mean ± 2 SE Uric acid sodium heparin
Mean ± 2 SE Creatinine lithium heparin
Mean ± 2 SE Creatinine sodium heparin
Mean ± 2 SE ALT lithium heparin
Mean ± 2 SE ALT sodium heparin
Wild
Captive
Population

Figura 2: Valores medios y error estándar de glucosa, colesterol, ácido úrico y creatinina con dos tipos de anticoagulante de heparina entre cocodrilos (*C. moreletii*) silvestres y en cautiverio en Campeche, México.

Figure 2: Mean and standard errors of glucose, cholesterol, uric acid and creatinine with two types of heparin as anticoagulant in wild and captive Morelet´s crocodiles (*C. moreletii*) in Campeche, Mexico.

similar results were obtained. In another research, the effect of the heparin type (lithium and sodium heparin) in the linfocyte proliferation in sea turtles (*Caretta caretta*) was analyzed. The results suggest that there are no significant differences between heparin types.[18]

Significant differences were found in the ALT values of the crocodiles, with the higher values obtained using sodium heparin. This might be attributed to hemolysis affecting the determination of ALT.[16] A minimal hemolysis was observed during laboratory analysis in some of the sodium heparin tubes. However, this is a subjective observation and further studies are needed to reach reliable conclusions on the effect of hemolysis and anticoagulant on plasma biochemicals of reptiles.

Lithium heparin is the most commonly recommended anticoagulant for the blood analysis of reptiles.[2] Sodium heparin is also used, but it has been reported that it causes hemolysis in the blood sample.[15] Lithium heparin was used in this study because it is the most commonly used anticoagulant in reptiles and it is easy to obtain a significant amount of blood for the biochemical blood tests (Table 3).

El tipo de anticoagulante utilizado puede afectar el tiempo de coagulación y las concentraciones de los valores sanguíneos.[2] El manejo de la muestra también es importante;[15] por ejemplo, en los parámetros de ALT existe una variación en sus concentraciones con respecto al tiempo que transcurre entre la toma de muestras y su análisis, debiendo ser éste lo más rápido posible.[16] En este estudio se fue muy cuidadoso en todo el proceso, tanto en los muestreos de cocodrilos silvestres como en cautiverio, por lo que se considera que este tipo de error no influyó en la variación de los valores.

En la comparación entre los dos tipos de anticoagulante utilizados no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros analiza-

Cuadro 3

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UNA VÍA (ANDEVA) PARA LAS VARIABLES SELECCIONADAS DE BIOQUÍMICA PLASMÁTICA ENTRE CLASES DE EDAD (CLASES II, III Y IV) EN *C. moreletii* EN CAMPECHE, MÉXICO (* DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS SIGNIFICATIVAS CONSIDERADAS A $P < 0.05$)

ONE WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA) FOR THE SELECTED VALUES OF PLASMA BIOCHEMISTRY AMONG AGE CLASSES (II, III AND IV) OF *C. moreletii* IN CAMPECHE, MEXICO (* STATISTICAL DIFFERENCES AT $P < 0.05$).

Parameter	*Sum of squares*	*df*	*Mean*	*F*	*P*
Lithium heparin					
Glucose	604.768	2	302.384	.665	.518
Cholesterol	27264.899	2	13632.450	1.727	.187
Uric acid	7.124	2	3.562	.496	.612
Creatinine	.727	2	.364	.315	.731
ALT	913.376	2	456.688	3.132	.051
Sodium heparin					
Glucose	2195.703	2	1097.852	2.562	.087
Cholesterol	22497.325	2	11248.663	1.281	.286
Uric acid	8.439	2	4.219	.516	.600
Creatinine	160.028	2	80.014	.691	.505
ALT	555.918	2	277.959	1.768	.180

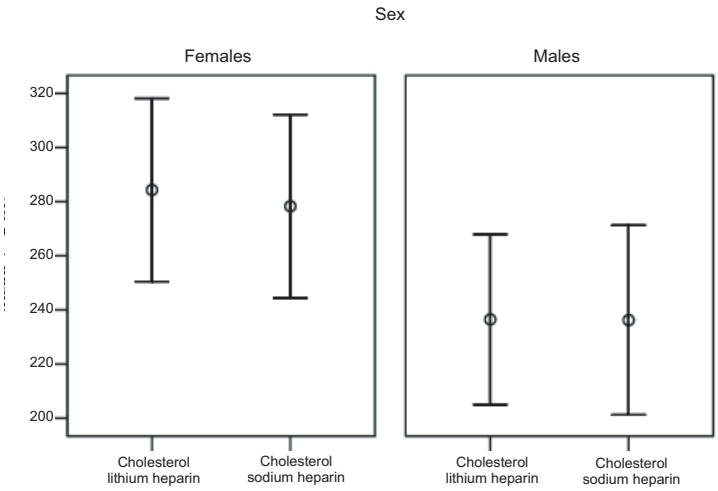

Figura 3: Media y error estándar en los valores de colesterol con dos tipos de heparinas como anticoagulantes en machos y hembras de *C. moreletii*, en Campeche, México.

Figure 3: Mean and standard error in the plasma biochemistry values of cholesterol with two types of heparin as anticoagulants in males and females Morelet´s crocodiles *C. moreletii* in Campeche, México.

les.[19] However, according to self-experience, the availability of lithium heparin tubes might be problematic in some regions of Latin America, such as the Yucatan peninsula, where sodium heparin is readily obtained from commercial human medical supply companies. More studies with paired samples using these anticoagulants and their effect on other metabolites are necessary in other species of reptiles. The results of this study suggest that the use of sodium heparin and lithium heparin does not affect the results of the selected plasma biochemistry parameters in both wild and captive populations of Morelet's crocodiles, therefore, future studies can use either one of these anticoagulants.

Acknowledgements

Special thanks to the personnel of Laboratorio Central de Patologia Animal del Comite Estatal para el Fomento y Produccion Pecuaria del Estado de Campeche, for their support in the laboratory analysis. To the Centro de Estudios Tecnologicos del Mar No 2, for allowing collection of samples of captive crocodiles. To the fisheries community of "Balantauche", to Javier Gomez, Mauricio Gonzalez, Ernesto Perera and Claudia Monzon, for their company and help during the field work.

Referencias

1. HANLEY CS, HERNANDEZ-DIVERS SJ, BUSH S, LATIMER KS. Comparison of the Effect dipotassium EDTA and Lithium Heparin on Hematologic Values in the Green Iguana (*Iguana iguana*). J Zoo Wildl Med 2004; 35:328-332.
2. CAMPBELL TW. Clinical Pathology. In: MADER DR, editor. Reptile Medicine and Surgery. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company 1996: 248-257.
3. STRIK NI, ALLEMAN AR, HARR KE. Circulating

dos. Lamentablemente no existen estudios similares realizados en cocodrilo de pantano o en otra especie de cocodrilianos, para comparar estos resultados. Sin embargo, los resultados concuerdan con estudios realizados en tortugas marinas (*Caretta caretta*[4] y *Dermochelys coriacea*),[5] en los que no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de heparinas en análisis bioquímicos realizados. Sin embargo, el primer trabajo[4] se realizó utilizando muestras pareadas, mientras que en el segundo se analizaron muestras independientes de tortugas.[5] En este estudio de *C. moreletii*, se analizaron muestras pareadas de cada individuo, en los que se obtuvieron resultados similares a los de los autores mencionados. En otro tipo de estudios donde se analiza el efecto de la heparina de litio y de sodio en la proliferación de linfocitos en las tortugas marinas (*Caretta caretta*), tampoco se encontraron diferencias significativas entre el uso de ambos tipos de anticoagulantes.[18]

En este trabajo se observaron diferencias significativas en los valores de ALT, aunque estas diferencias no son clínicamente relevantes, los niveles son mayores si se utiliza heparina de sodio como anticoagulante. Lo anterior puede deberse, en parte, a que las muestras hemolizadas interfieren en la determinación del ALT.[16] En el trabajo de laboratorio realizado se observó ligera hemólisis en algunas muestras de sangre tratadas con anticoagulante de heparina de sodio. Las causas de hemólisis son muchas y variadas, por ello se requiere cuantificar la hemólisis en futuros estudios para determinar estos patrones con precisión, así como estandarizar el uso y tipo de anticoagulante en los estudios hematológicos de reptiles.

El uso de heparina de litio es altamente recomendado en reptiles.[19] Sin embargo, según la experiencia, la disponibilidad de material de laboratorio con este anticoagulante en algunas regiones de América Latina, como en la península de Yucatán, es menor que

aquella con heparina de sodio, que es más común por su uso en medicina humana. Es recomendable realizar este tipo de comparaciones pareadas, así como en la determinación de otros metabolitos en los análisis hematológicos de otros reptiles en México. Los resultados de este estudio sugieren que la utilización de la heparina de litio o la heparina de sodio no interfieren en los resultados de estos análisis de bioquímica plasmática en cocodrilos, por lo que en estudios posteriores se podrían utilizar indistintamente uno u otro tipo de anticoagulante.

Agradecimientos

Se agradece al Laboratorio Central de Patología Animal del Comité Estatal para el Fomento y Producción Pecuaria, de Campeche, el apoyo para realizar los análisis bioquímicos, así como al Centro de Estudios Tecnológicos del Mar núm. 2, por el apoyo en la recolección de muestras de cocodrilos en cautiverio, al igual que a la cooperativa pesquera "Balantauché", a Javier Gómez, Mauricio González, Ernesto Perera y Claudia Monzón, por su apoyo durante el trabajo de campo.

Inflammatory Cells. In: JACOBSON ER, editor. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2007: 167-218.
4. BOLTEN A B, JACOBSON ER, BJORNDAL KA. Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Am J Vet Res 1992; 53: 2224–2227.
5. DEEM SL, DIERENFELD ES, SOUNGUET GP, ALLEMAN AR, CRAY C, POPPENGA RH *et al.* Blood Values in Free Ranging Nesting Leatherback sea Turtles (*Dermochelys coriacea*) on the Coast of the Republic of Gabon. J Zoo Wildl Med 2006; 37: 464-471.
6. CONANP. Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Los Petenes. México DF: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2006.
7. PLATT SG, THORBJARNARSON JB. Status and Conservation of the American crocodile *Crocodylus acutus*, in Belize. Biol Cons 2000; 96:13-20.
8. THORBJARNARSON J, PLATT SG, TUN KHAING SA. Population Survey in the Ayeyarwady Delta, Myanmar. Orix 2000; 34:317-324.
9. WEBB G, MANOLIS C, SACK GC. Cloacal Sexing of Hatchling Crocodiles. Aust Wildl Res 1984;11:201–202.
10. PLATT SG, THORBJARNARSON JB. Population Status and Conservation of Morelet's Crocodile *Crocodylus moreletii* in Northern Belize. Biol Cons 2000; 96:21-29
11. SIGLER L, LEÓN-OJEDA F, DOMÍNGUEZ-LASO J, LÓPEZ-OZUNA L, LAVÍN-MURCIO P, Hinojosa-Falcón O. "Muestreos de poblaciones silvestres de Cocodrilos de Morelet *Crocodylus moreletii* en varios estados de la República Mexicana". In: SIGLER L, DOMÍNGUEZ-LASO J, editores. Memorias de la V reunión de trabajo del COMACROM 2002; 2002 noviembre 3-6; Tuxtla (Glutiérrez) Chiapas. Tuxtla (Gutiérrez) Chiapas: ZOOMAT/IHNE, 2002: 120.
12. JACOBSON ER. Inmobilization, Blood Sampling, Necropsy Techniques and Disease of Crocodilians: a Review. J Zoo Wildl Med 1984; 15:38-45.
13. LILLYWHITE HB, SMITS AN. Lability of Blood Volume in Snakes and its Relation to Activity and Hypertension. J Exp Biol 1984, 110:267
14. KÖHLER G. Diseases of Amphibians and Reptiles. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company. 2006: 171
15. JACOBSON ER. Collecting biological samples for clinical evaluation. College of Veterinary Medicine, University of Florida. [Serial online: 2006 Nov] [Cited: 2008 March]. Available from: URL: http//iacuc.ufl.edu/AnimalUseGuides/BiolSampColl.doc
16. WIENER LAB. Manual del usuario. Rosario, Argentina: Wiener Laboratorios, 2000.
17. FOWLER J, COHEN L, JARVIS P. Practical Statistics for Field Biology. 2nd ed. London, UK: John Wiley and Sons, 2006.
18. KELLER JM, MCCLELLAN-GREEN PD, LEE AM, ARENDT MD, MAIER PP, SEGARS AL *et al.* Mitogen-induced lymphocyte proliferation in loggerhead sea turtles: comparison of methods and effects of gender, plasma testosterone concentrations and body condition on immunity. Vet Immunol Immunopathol 2005; 103:269-281.
19. FRYE FL. Hematology as Applied to Clinical Reptile Medicine. In: FRYE FL, editor. Reptile Care: An Atlas of Diseases and Treatments. Vol 1. New Jersey: TFH Publications INC, 1991: 209-262.